

1/5/2

DIALOG(R) File 351:DERWENT WPI

(c)1998 Derwent Info Ltd. All rts. reserv.

008571422

WPI Acc No: 91-075455/199111

XRAM Acc No: C91-032009

Prepn. of factor VIII-von-willebrand factor complex concentrate - by
pre-purifying whole plasma with barium chloride and aluminium hydroxide
then purifying by chromatography on anion exchange resin

Patent Assignee: CENT REGIONAL TRANSFUSION SANGUINE (REGI-N); CENT REG
TRANS SANG (REGI-N); BURNOUF-RADOSEVICH (BURN-I); CENT REGIONAL TRANS
(REGI-N); CENT REGIONAL TRANSFUSION SANGUINE LILLE (REGI-N)

Inventor: BURNOUF T; BURNOUF-RADOSEVICH M; BURNOUF THIERRY B T; BURNOUF RAD
M

Number of Countries: 025 Number of Patents: 019

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Main IPC	Week
EP 416983	A	19910313	EP 90402395	A	19900830		199111 B
NO 9003865	A	19910306					199119
CA 2024667	A	19910306					199120
FR 2651437	A	19910308	FR 8911567	A	19890905		199120
FI 9004381	A	19910306					199123
HU 56858	T	19911028					199147
BR 9004626	A	19920324					199217
AU 9062218	A	19920312	AU 9062218	A	19900906	C07K-003/22	199220
JP 4124199	A	19920424				C07K-015/06	199223 N
DD 298110	A5	19920206	DD 343869	A	19900905	C07K-015/06	199227
CZ 9004312	A3	19930113	CS 904312	A	19900905	A61K-037/02	199319
EP 416983	B1	19930728	EP 90402395	A	19900830	A61K-035/16	199330
DE 69002427	E	19930902	DE 602427	A	19900830	A61K-035/16	199336
			EP 90402395	A	19900830		
CZ 277939	B6	19930616	CS 904312	A	19900905	A61K-037/02	199337
ES 2057475	T3	19941016	EP 90402395	A	19900830	A61K-035/16	199442
RU 2025129	C1	19941230	SU 4831275	A	19900904	A61K-035/16	199531
FI 95654	B	19951130	FI 904381	A	19900905	A61K-035/16	199601
NO 178716	B	19960212	NO 903865	A	19900905	A61K-025/16	199611
US 5679776	A	19971021	US 90577368	A	19900905	A61K-038/36	199748

Priority Applications (No Type Date): FR 8911567 A 19890905

Cited Patents: EP 104356; EP 176926; EP 359593; EP 53046; FR 2184898; US
4386068; US 4435318

Patent Details:

Patent Kind Lan Pg Filing Notes Application Patent

EP 416983	A																		
Designated States (Regional): AT BE CH DE ES FR GB GR IT LI LU NL SE																			
JP 4124199	A		7																
EP 416983	B1 F		9																
Designated States (Regional): AT BE CH DE DK ES FR GB GR IT LI LU NL SE																			
DE 69002427	E																		
CZ 277939	B6																		
ES 2057475	T3																		
RU 2025129	C1		6																
FI 95654	B																		
NO 178716	B																		
US 5679776	A		5																

Abstract (Basic): EP 416983 A

A process for the preparation of a stable Factor VIII-von Willebrand factor concentrate with a high specific activity is claimed. The process involves pre-purifying whole blood plasma by a double treatment with barium chloride and aluminium hydroxide and purifying by chromatography using an anion exchange resin which allows retention of very large molecules. The plasma may be fresh or frozen. The plasma may

be added to a stabilising mixture containing 2.0-2 micro/ml heparin, 1-5 mM EDTA and 1-10 mM CaCl₂, optionally with glucose at a concentration of 5-60 g/l. The pre-purification preferably comprises precipitation from barium chloride followed by centrifugation and recuperation of the supernatant; adsorption on aluminium hydroxide gel followed by cold centrifugation and recuperation of the supernatant, and finally a de-salting treatment. Factor VIII-von Willebrand factor concentrates and protein concentrates derived from the plasma are also claimed, as is their therapeutic usage.

USE/ADVANTAGE - In the treatment of haemophilia the process is simple and gives a high purity, stable concentration in good yield. Since the plasma does not need prior cryoprecipitation, losses of Factor VIII are reduced. The pre-purification step eliminates the constituents of the prothrombinic complex (Factors II, VII, IX, X). (6pp Dwg.No.0/0)

Title Terms: PREPARATION; FACTOR; VON-WILLEBRAND; FACTOR; COMPLEX;
CONCENTRATE; PRE; PURIFICATION; WHOLE; PLASMA; BARIUM; CHLORIDE;
ALUMINIUM; HYDROXIDE; PURIFICATION; CHROMATOGRAPHY; ANION; EXCHANGE;
RESIN

Derwent Class: B04

International Patent Class (Main): A61K-025/16; A61K-035/16; A61K-037/02;
A61K-038/36; C07K-003/22; C07K-015/06

International Patent Class (Additional): A61K-037/04; A61K-037/465;
A61K-038/37; C07K-001/30; C07K-001/36; C07K-003/02; C07K-003/18;
C07K-003/24; C07K-003/28; C07K-014/475; C07K-014/755; C12N-009/48;
G01N-033/86

File Segment: CPI

(19)



Europäisches Patentamt
European Patent Office
Offic européen des brevets



(11) Numéro de publication: **0 416 983 A1**

(12)

DEMANDE DE BREVET EUROPEEN

(21) Numéro de dépôt: 90402395.9

(51) Int. Cl.⁵: **A61K 35/16**

(22) Date de dépôt: 30.08.90

(30) Priorité: 05.09.89 FR 8911567

(43) Date de publication de la demande:
13.03.91 Bulletin 91/11

(84) Etats contractants désignés:
AT BE CH DE DK ES FR GB GR IT LI LU NL SE

(71) Demandeur: **CENTRE REGIONAL DE
TRANSFUSION SANGUINE DE LILLE**
19-21 rue Camille Guérin
F-59012 Lille(FR)

(72) Inventeur: **Burnouf-Radosevich, Miryana**
5, rue du Docteur Schaffner
F-59136 Wavrin(FR)
Inventeur: **Burnouf Thierry**
5, rue du Docteur Schaffner
F-59136 Wavrin(FR)

(74) Mandataire: **Lhuillier, René et al**
ARMENGAUD JEUNE CABINET LEPEUDRY 6,
rue du Fg. St-Honoré
F-75008 Paris(FR)

(54) **Procédé de préparation de concentré du complexe Facteur VIII-facteur von Willebrand de la coagulation sanguine à partir de plasma total.**

(57) L'invention concerne un procédé de préparation d'un concentré de complexe Facteur VIII-facteur von Willebrand à haute activité spécifique à partir de plasma total (non cryoprécipité).

Le procédé comprend une prépurification par un double traitement au chlorure de baryum et à l'hydroxyde d'aluminium.

Le procédé comprend ensuite une purification par chromatographie sur résine échangeuse d'anions, de type DEAE-Fractogel.

Le procédé comprend une étape d'inactivation virale par un traitement au solvant-détergent.

Le procédé permet également de récupérer du fibrinogène, de l'albumine, des immunoglobulines, de l'antithrombine III, de la fibronectine et du complexe prothrombinique, à partir du même plasma.

Les différents concentrés obtenus par le procédé de l'invention sont destinés notamment à un usage thérapeutique.

EP 0 416 983 A1

PROCÉDÉ DE PRÉPARATION DE CONCENTRÉ DU COMPLEXE FACTEUR VIII-FACTEUR VON WILLEBRAND DE LA COAGULATION SANGUINE À PARTIR DE PLASMA TOTAL

L'invention concerne un procédé de préparation d'un concentré du complexe Facteur VIII - facteur von Willebrand à haute activité spécifique à partir du plasma sanguin total.

Le traitement de l'hémophilie A par l'injection de Facteur VIII est couramment pratiqué et nécessite l'utilisation de préparations de haute pureté, d'une part pour réduire les risques de contamination virale, d'autre part parce que les injections doivent être souvent répétées et que tout excès de matériel contaminant pourrait déclencher des réactions immunitaires indésirables et dangereuses pour le patient.

Plusieurs méthodes sont déjà utilisées dans les centres industriels de traitement du plasma humain pour purifier le Facteur VIII. Ces méthodes comprennent des précipitations des protéines contaminantes par divers agents chimiques, des chromatographies de tamisage moléculaire, des chromatographies d'immunoaffinité, des chromatographies d'échange d'ions et diverses combinaisons de ces différentes méthodes.

Le Facteur VIII étant présent en faible quantité dans le plasma, le rendement des procédés de purification est le principal problème à résoudre. En outre le Facteur VIII est une protéine instable et qui peut être activée par d'autres facteurs sanguins or à l'état activé il perd son intérêt thérapeutique ; les procédés de purification et de dosage final doivent donc être adaptés à ce problème.

La Demanderesse a déjà mis au point une méthode de purification par chromatographie d'échange d'ions qui a été décrite dans la demande de brevet français 88 07530 et qui permet d'obtenir un concentré de Facteur VIII de haute pureté.

Toutefois dans ce procédé, comme dans ceux utilisés par d'autres producteurs, on utilise comme matériau de départ une fraction cryoprécipitée du plasma. Cette étape de cryoprécipitation cause une perte de 30 à 40 % du Facteur VIII qui reste dans le surnageant.

Il serait donc avantageux de mettre au point un procédé de préparation à partir du plasma total non cryoprécipité pour limiter les pertes en Facteur VIII. En outre un tel procédé représenterait une simplification très avantageuse pour des centres de production mal équipés où la cryoprécipitation peut être difficile à réaliser.

C'est pourquoi la Demanderesse a mis au point un procédé simplifié de purification du Facteur VIII à partir du plasma total qui assure l'obtention d'un concentré de haute pureté et stable, avec un très bon rendement.

L'invention concerne donc un procédé de préparation d'un concentré de Facteur VIII à partir d'un plasma total, procédé qui comprend une pré-purification destinée à éliminer les constituants du complexe prothrombinique (Facteurs II, VII, IX, X) et une purification par chromatographie d'échange d'anions qui, par le choix du gel et du tampon d'élution permet d'obtenir un concentré du complexe Facteur VIII -facteur von Willebrand de haute pureté.

Le procédé permet également d'obtenir, après une étape de purification supplémentaire, des solutions purifiées des autres protéines du plasma comme le fibrinogène, la fibronectine, l'albumine, les immunoglobulines et l'antithrombine III.

Le procédé a été mis au point sur du plasma humain mais il est également applicable à un plasma d'origine animale.

Le procédé selon la présente invention permet donc d'utiliser comme matériau de départ un plasma total, c'est à dire un plasma frais ou congelé pour sa conservation, mais non cryoprécipité. Ce plasma aura été avantageusement récolté en présence de solution anticoagulante ou de stabilisant. Classiquement on utilise un mélange citrate-dextrose-phosphate ; tout stabilisant spécifique du Facteur VIII pourra avantageusement y être ajouté ou substitué.

Comme solution stabilisante du plasma de départ on utilisera avantageusement un mélange d'héparine à 0,2 à 2 U/ml, d'EDTA à 1 à 5 mM, de CaCl_2 1 à 10 mM, éventuellement additionné de glucose à une concentration comprise entre 5 et 60 g/l.

Le procédé selon la présente invention comprend une première étape de prépurification qui combine une précipitation au chlorure de baryum et une adsorption sur gel d'hydroxyde d'aluminium.

Le traitement au chlorure de baryum est avantageusement réalisé sur le plasma dont le pH est ajusté à 6,5, par addition d'une solution 1 M en chlorure de baryum jusqu'à obtention d'une concentration finale de 0,08 M, sous agitation, et est suivi d'une centrifugation à 5° à 10° C destinée à éliminer les protéines précipitées, puis de la récupération du surnageant. Les protéines précipitées pourront avantageusement être récupérées pour la production du complexe prothrombinique ou de ses constituants.

Le surnageant est ensuite mis en présence de gel d'hydroxyde d'aluminium à 3 %, à pH 6,5, qui adsorbe les protéines contaminantes résiduaires ; ce traitement est suivi d'un refroidissement à 5° à 8° C en cryostat, d'une centrifugation à 5° C et d

la récupération du sumageant, qui est maintenu à 5° à 8°C.

Ce sumageant doit subir un dessalage qui peut être effectué soit par ultrafiltration en présence du tampon d'équilibrage de la chromatographie suivante additionné d'héparine à 0,5 à 2 U/ml, soit par chromatographie sur Sephadex G25 dans le même tampon.

Le procédé selon la présente invention comprend ensuite une séparation par chromatographie d'échange d'anions. La Demanderesse a déjà décrit dans la demande de brevet français 88 07530, les avantages qu'elle a mis en évidence d'un type de résine qui offre un faible pouvoir d'échange ionique et qui présente des pores de grande dimension, ceux-ci permettant la rétention de molécules de très grande taille. Cette rétention prolongée permet l'établissement de liaisons de caractère faiblement hydrophobe avec la résine et le choix de la force ionique du tampon permet une désorption sélective des molécules fixées.

Des résines de ce type sont disponibles dans le commerce sous l'appellation générique Fractogel. On peut ainsi utiliser le DEAE-Fractogel 650 (M) et le T- ou D-MAE-Fractogel (Merck). Ces mêmes résines sont actuellement disponibles sous une forme qualifiée par le fournisseur de "résines de type tentaculaire". La structure de leur matrice est modifiée afin d'augmenter la surface de fixation des charges positives ce qui peut favoriser une augmentation de la capacité du gel.

Le tampon d'équilibrage de la chromatographie est un tampon à base de citrate de sodium et de chlorure de sodium, ajusté à pH 7, qui contient avantageusement du chlorure de calcium à une concentration comprise entre 0,5 et 6 mM et de la lysine à une concentration de l'ordre de 2 à 4 g/l et du glycocole à une concentration de 8 à 11 g/l. La mise en oeuvre du procédé comprendra des augmentations définies de cette concentration en chlorure de sodium.

La mise en oeuvre du procédé de purification selon l'invention comprend l'injection de la préparation prépurifiée décrite plus haut sur la colonne de chromatographie. Dans les conditions définies (0,11 M NaCl), la colonne peut fixer les molécules de très grande taille comme le complexe facteur von Willebrand-Facteur VIII et laisse passer dans le filtrat le fibrinogène, l'albumine, les immunoglobulines, l'antithrombine III et la fibronectine.

Selon un mode de réalisation préféré de l'invention qui vise à obtenir le meilleur rendement de récupération du Facteur VIII, la force ionique du tampon d'élution de la chromatographie est augmentée une seule fois, à 0,27 M de chlorure de sodium. Selon un autre mode de réalisation de l'invention cette élution est précédée par un prélavage par augmentation de la force ionique à 0,13

M de chlorure de sodium, ce qui élimine la fibronectine.

Le complexe Facteur VIII-facteur von Willebrand désorbé et élué dans ces conditions présente une activité spécifique au moins égale à 5 à 10 U/mg. Le rendement global du procédé est au moins égal à 350 U/litre de plasma initial et peut être au moins égal à 500 U/litre quand le plasma initial est additionné du mélange stabilisant décrit plus haut.

En fonction de son utilisation ultérieure, cette solution de complexe Facteur VIII-facteur von Willebrand peut encore être soumise à une étape supplémentaire de purification et particulièrement de concentration par une nouvelle chromatographie. Celle-ci pourra être effectuée, comme la précédente, sur DEAE- ou T/D-MAE-Fractogel ou sur d'autres résines; d'autres supports comme le sulfate de dextran, l' amino-hexyl immobilisé, l'héparine immobilisée, les résines de sulfopropyle, d'affinité ou d'immunoaffinité peuvent aussi être utilisés.

Cette chromatographie supplémentaire est effectuée dans le même tampon de base que la précédente. Selon un mode de réalisation préféré de l'invention qui vise à obtenir du Facteur VIII le plus concentré possible, cette chromatographie supplémentaire est effectuée dans les mêmes conditions que la première, c'est-à-dire avec une seule étape de désorption par augmentation de la force ionique du tampon à 0,27 M NaCl. Selon un autre mode de réalisation de l'invention, par une première augmentation de la force ionique du tampon à 0,13 M on élimine les protéines contaminantes résiduelles et par une seconde augmentation à 0,27 M on récupère le complexe Facteur VIII - facteur von Willebrand concentré de haute pureté, qui présente alors une activité spécifique au moins égale à 10 à 20 U/mg.

Les autres protéines du premier filtrat de la colonne comme les immunoglobulines, l'albumine, l'antithrombine III, le fibrinogène et la fibronectine peuvent également être purifiées et concentrées par des méthodes chromatographiques classiques.

Le procédé selon la présente invention comprend également un traitement d'inactivation virale selon une technique connue. Dans le cas où on utilise un agent chimique, par exemple un traitement par solvant-détergent, il sera judicieux d'effectuer ce traitement avant l'une quelconque des étapes chromatographiques pour que celle-ci assure l'élimination des agents d'inactivation.

Les concentrés du complexe Facteur VIII-facteur von Willebrand et des autres protéines plasmatiques obtenus par le procédé décrit sont aussi l'objet de la présente invention.

Lesdits concentrés sont conditionnés selon les normes de la pharmacopée et peuvent être destinés à un usage thérapeutique.

Les exemples suivants illustrent deux modes

de réalisation de l'invention sans toutefois en limiter la portée.

EXEMPLE 1

On utilise 250 ml de plasma frais ou congelé-décongelé à 22-25°C, récolté en présence d'anticoagulant/stabilisant (citrate-dextrose-phosphate, par exemple), et ajusté à un pH de 6,5 par de l'acide acétique.

a) Prépurification

On y ajoute 20 ml de chlorure de baryum 1 M à pH 6,5 au moyen d'une pompe péristaltique jusqu'à obtention d'une concentration finale de 0,08 M. L'addition se fait à un débit de 4 à 8 ml par minute puis le mélange est laissé sous agitation, à température ordinaire, pendant 15 minutes.

Le mélange est ensuite centrifugé à 2.700 tours/minute pendant 20 minutes, à 8°C, puis le surnageant est récupéré.

Le surnageant est ensuite adsorbé sur un gel d'hydroxyde d'aluminium (Alhydrogel Eurobio à 3 % d'Al(OH)₃) à raison de 2,3 g/l de plasma. Le pH est ajusté à 6,5 et la température est abaissée jusqu'à 5°C en cryostat. Le mélange est centrifugé à 5°C à 2700 tours/minute pendant 20 minutes et le surnageant est récupéré et maintenu à 5°C.

Ce traitement permet l'élimination des composants du complexe prothrombinique (Facteurs II, VII, IX, X) qui peuvent être récupérés et purifiés selon des procédés connus.

On obtient des résultats particulièrement satisfaisants par la combinaison de ces deux traitements, alors qu'un traitement à l'alhydrogel seul ne permet pas d'éliminer complètement la prothrombine et les autres composants du PPSB et qu'un traitement au chlorure de baryum seul laisse subsister du Facteur X, de la prothrombine et surtout du Facteur VII.

Le surnageant récolté est dessalé soit par ultrafiltration en présence du tampon de la chromatographie suivante (voir plus bas) additionné de 1 U/ml d'héparine, soit par chromatographie sur Sephadex G25, dans le même tampon.

Un traitement d'inactivation virale classique au solvant-détergent est ensuite appliqué, pendant 6 heures à 24°C (Cette méthode de traitement a été décrite dans la demande de brevet européen n° 0 131 740).

b) Purification par chromatographie

Le surnageant prépurifié et dialysé est soumis

à une étape de purification par chromatographie. On utilise une colonne K26/30 (Pharmacia-Uppsala-Suède) d'un diamètre de 2,6 cm et d'une hauteur utile de 30 cm, remplie sur 10 cm par la résine DEAE-Fractogel-TSK 650(M) (Merck).

Le tampon d'équilibrage de la colonne et de charge de l'échantillon a la composition suivante : citrate de sodium 10 mM, chlorure de calcium 1 mM, glycolle 9 g/l, lysine 3 g/l. Ce tampon est additionné de chlorure de sodium, ajusté à une concentration finale de 0,11 M et à un pH de 7. L'échantillon est injecté sur la colonne à un débit de 100 ml/h.

La colonne est lavée avec le tampon d'équilibrage pour éliminer les protéines non adsorbées, qui comprennent le fibrinogène, l'albumine, les immunoglobulines, l'antithrombine III et la fibronectine ainsi que les agents d'inactivation virale.

Le complexe Facteur VIII-facteur von Willebrand est ensuite désorbé par augmentation de la force ionique du tampon à 0,27 M de chlorure de sodium.

La solution de Facteur VIII obtenue par ce procédé présente une activité spécifique de 5 à 10 UI/mg et le rendement de la purification par rapport au plasma injecté sur la colonne est de 60 à 80 %.

On observe toujours un rapport proche de 1U/1U pour la concentration des deux facteurs VIII et von Willebrand, ce dernier étant exprimé en unités de cofacteur de la ristocétine.

La pureté de cette solution de Facteur VIII peut encore être légèrement améliorée par une étape supplémentaire de séparation chromatographique qui permet de concentrer le produit. On utilise par exemple une seconde colonne de DEAE-Fractogel, dans les mêmes conditions de charge que précédemment, et on effectue un prélavage à 0,13 M de NaCl, ce qui élimine les protéines contaminantes résiduelles. La force ionique du tampon est ensuite augmentée à 0,27 M de chlorure de sodium pour désorber et élué le complexe Facteur VIII-facteur von Willebrand hautement purifié et concentré.

La deuxième étape de concentration par chromatographie peut être remplacée par une ultrafiltration.

Selon le mode de réalisation habituel de la présente invention, la première purification par chromatographie est réalisée sur une résine de DEAE-Fractogel. Toutefois de très bons résultats ont également été obtenus avec les nouvelles résines commercialisées par Merck, comme le TMAE-Fractogel (TMAE = Tri. Methyl. Amino. Ethyl) ou le DMAE-Fractogel (DMAE = Di-MAE), qui présentent des propriétés équivalentes à celles du DEAE-Fractogel. On peut également utiliser les nouvelles résines de type "tentaculaire" mises au point par la société Merck et présentées par W. Müller à la "Conférence on Liquid chromatography", juin 1989,

à Stockholm.

EXEMPLE 2

Un autre mode de réalisation de la présente invention permet également de préparer des concentrés de fibrinogène et de fibronectine tout en fournissant un Facteur VIII-facteur von Willebrand concentré avec un rendement plus faible et une activité spécifique légèrement améliorée.

Le procédé est identique à celui de l'exemple 1 jusqu'à l'élution du Facteur VIII-facteur von Willebrand de la première colonne de DEAE-Fractogel.

Le fibrinogène, l'antithrombine III, l'albumine et les immunoglobulines ne sont pas retenus par la colonne et peuvent être récupérés dans le filtrat.

Le complexe Facteur VIII-facteur von Willebrand peut être purifié et concentré par une deuxième séparation chromatographique sur une colonne de DEAE-Fractogel, avec le tampon d'équilibre à une force ionique de 0,17 M de chlorure de sodium pour ne pas fixer des protéines contaminantes résiduelles ; une augmentation de la force ionique à 0,27 M de chlorure de sodium permet de désorber et éluer le complexe Facteur VIII-facteur von Willebrand. On obtient ainsi une activité spécifique de 10 à 20 IU/mg.

Le fibrinogène et la fibronectine peuvent ensuite être purifiés et concentrés, selon des méthodes chromatographiques connues, pour donner des solutions d'une qualité conforme pour un usage thérapeutique et qui ont été décrites dans la demande de brevet français n° 88 07530.

Les autres protéines du plasma peuvent être purifiées-concentrées selon des méthodes classiques de fractionnement.

EXEMPLE 3

On peut encore améliorer le rendement de la purification en stabilisant le plasma de départ, dès sa décongélation à 25°C, par l'addition du mélange suivant :

héparine 1 U/ml

EDTA 2 mM, soit 0,74 g/l

chlorure de calcium 6 mM, soit 0,67 g/l

On peut encore ajouter à ce mélange du glucose à une concentration comprise entre 5 et 60 g/l.

Le pH est ensuite abaissé à 6,5 par l'addition d'acide acétique.

Les étapes de purifications sont ensuite appliquées comme dans l'exemple 1 ou 2.

Dans ces conditions, le rendement global du procédé de purification est au moins égal à 500 U de FVIII:C/litre de plasma initial.

Ceci correspond à un récupération globale d

55 à 65% de l'activité de Facteur VIII pour une activité spécifique comprise entre 10 et 30 unités de FVIII:C/mg de protéine.

Revendications

1.- Procédé de préparation d'un concentré de Facteur VIII-facteur von Willebrand stable et à haute activité spécifique caractérisé en ce qu'on soumet un plasma total à une prépurification par un double traitement au chlorure de baryum et à l'hydroxyde d'aluminium et à une purification par chromatographie sur un gel échangeur d'anions permettant la rétention de molécules de très grande taille.

2.- Procédé selon la revendication 1 caractérisé en ce que le plasma total est un plasma frais ou congelé.

3 - Procédé selon la revendication 1 ou 2 caractérisé en ce que le plasma est additionné d'un mélange stabilisant comprenant de l'héparine à 0,2 à 2 U/ml, de l'EDTA à 1 à 5 mM et du CaCl₂ à 1 à 10 mM.

4 - Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce que le mélange stabilisant comprend, en outre du glucose à une concentration comprise entre 5 et 60 g/l.

5 - Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 caractérisé en ce que la prépurification comprend :

a) une précipitation au chlorure de baryum suivie d'une centrifugation et de la récupération du surnageant,

b) une adsorption sur gel d'hydroxyde d'aluminium suivie d'une centrifugation à froid et de la récupération du surnageant,

c) un traitement de dessalage.

6- Procédé selon la revendication 5 caractérisé en ce que la précipitation au chlorure de baryum est effectuée par addition d'une solution de chlorure de baryum 1 M à pH 6,5, sous agitation, et est suivie d'une centrifugation à 5 à 10°C et de la récupération du surnageant.

7.- Procédé selon la revendication 5 ou 6 caractérisé en ce que l'adsorption sur gel d'hydroxyde d'aluminium est réalisée avec un gel à 3%, à un pH de 6,5 et est suivie d'un refroidissement rapide à 5°C, d'une centrifugation à 5°C et de la récupération du surnageant.

8.- Procédé selon l'une quelconque des revendications 5 à 7 caractérisé en ce que le traitement de dessalage est effectué par ultrafiltration en présence du tampon d'équilibre de la chromatographie suivante, additionné d'héparine.

9.- Procédé selon l'une quelconque des revendications 5 à 7 caractérisé en ce que le traitement de dessalage est effectué par chromatographie sur colonne de Séphadex G 25, n tampon d'équilibre

ge de la chromatographie suivante, additionné d'héparine.

10 - Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 9 caractérisé en ce que le surnageant du plasma ayant subi une prépurification est injecté sur une colonne de chromatographie renfermant un gel échangeur d'anions qui n'exclut pas les molécules de très grande taille et laisse passer dans le filtrat le fibrinogène, l'albumine, les immunoglobulines, l'antithrombine III et la fibronectine.

11 - Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 10 caractérisé en ce que le gel de chromatographie est un gel de type polymère vinylique greffé de groupements de type DEAE ou T-ou D-MAE.

12.- Procédé selon la revendication 11 caractérisé en ce que le gel de polymère est du Fractogel.

13.- Procédé selon l'une quelconque des revendications 10 à 12 caractérisé en ce que le tampon d'équilibrage de la chromatographie est un tampon à base de citrate de sodium et de chlorure de calcium, qui contient du glyco-colle et de la lysine, qui est additionné de chlorure de sodium 0,11 M et est ajusté à pH 7.

14.- Procédé selon la revendication 13 caractérisé en ce que le tampon contient 8 à 11 g/l de glyco-colle et 2 à 4 g/l de lysine.

15.- Procédé selon l'une quelconque des revendications 10 à 14 caractérisé en ce que la force ionique du tampon est augmentée à 0,27 M de chlorure de sodium pour désorber le complexe Facteur VIII-facteur von Willebrand de la colonne de chromatographie.

16.- Procédé selon l'une quelconque des revendications 10 à 14 caractérisé en ce que la force ionique du tampon est augmentée à 0,13 M de chlorure de sodium ce qui élimine la fibronectine puis à 0,27 M de chlorure de sodium pour désorber le complexe Facteur VIII-facteur von Willebrand de la colonne de chromatographie.

17 - Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 16 caractérisé en ce que le complexe Facteur VIII-facteur von Willebrand désorbé de la colonne de chromatographie est soumis à une étape supplémentaire de purification-concentration par chromatographie.

18.- Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 17 caractérisé en ce que la chromatographie supplémentaire est effectuée sur une résine échangeuse d'ions choisie parmi le DEAE- ou T-D-MAE-Fractogel, l'amino-hexyl immobilisé, l'héparine immobilisée, le sulfate de dextran, le sulfo-propyle, ou sur résine d'affinité ou d'immunoaffinité.

19 - Procédé selon la revendication 17 ou 18 caractérisé en ce que la chromatographie supplémentaire est effectuée en tampon ajusté à 0,11 M de chlorure de sodium et comprend 2 augmenta-

tions successives de la force ionique à 0,13 M puis à 0,27 M.

20.- Procédé selon la revendication 17 ou 18 caractérisé en ce que la chromatographie supplémentaire est effectuée en tampon ajusté à 0,17 M de chlorure de sodium et comprend une seule augmentation de la force ionique à 0,27 M.

21.- Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 14 caractérisé en ce que les protéines du filtrat de la chromatographie selon la revendication 10, sont soumises à une étape supplémentaire de purification-concentration.

22.- Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 21 caractérisé en ce qu'on effectue un traitement classique d'inactivation virale par solvant-détergent avant l'une quelconque des étapes de chromatographie.

23.- Concentré de complexe Facteur VIII-facteur von Willebrand caractérisé en ce qu'il est obtenu par un procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 22.

24.- Concentrés de protéines dérivées du plasma caractérisés en ce qu'ils sont obtenus par un procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 14 et 21 ou 22.

25.- Concentrés selon la revendication 23 ou 24 caractérisés en ce qu'ils sont conditionnés pour un usage thérapeutique.



Office européen
des brevets

RAPPORT DE RECHERCHE EUROPEENNE

Numero de la demande

EP 90 40 2395

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS			
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (Int. CL5)
X, P, D	EP-A-359593 (CENTRE REGIONAL DE TRANSFUSION SANGUINE DE LILLE) * le document en entier *	1-25	A61K35/16
A	FR-A-2184898 (BAXTER LABORATORIES) * page 4 *	1-25	
A	US-A-4435318 (PABST P.L. ET AL) * colonne 4 *	1-25	
A	US-A-4386068 (MITRA G. ET AL) * colonne 1 *	1-25	
A	EP-A-104356 (THE UNIVERSITY OF ROCHESTER) * page 7 *	1-25	
A	EP-A-53046 (ROCK G.A.) * revendications 1-6 *	1-25	
A	EP-A-176926 (MILES LABORATORIES) * le document en entier *	1-25	
			DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. CL5)
			A61K
Le présent rapport a été établi pour toutes les revendications			
Lieu de la recherche BERLIN		Date d'achèvement de la recherche 17 OCTOBRE 1990	Examinateur AVEDIKIAN P. F.
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES			
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : artère-plus technologique : divulgation non-écrite P : document intercalaire		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant	